

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. ⁶ C12N 15/53	(11) 공개번호 특1998-069057
	(43) 공개일자 1998년10월26일
(21) 출원번호 (22) 출원일자 (71) 출원인	특1997-005929 1997년02월26일 한국과학기술연구원 박원훈 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1
(72) 발명자	최의성 대전광역시 유성구 궁동 395-3 다슬아파트 102-507 이상기 서울특별시 광진구 광장동 극동빌라 가동 101호 이은혜 대전광역시 서구 정림동 우성아파트 112-1305
(74) 대리인	오규환, 이남경

심사청구 : 있음

(54) 글루코노박터 서브옥시단스의 솔비톨 탈수소효소 및 이의 유전자

요약

본 발명은 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111) 균주의 원형질막에 존재하는 솔비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase) 및 이를 코드하는 유전자에 관한 것이다. 글루코노박터 서브옥시단스로부터 분리, 정제된 솔비톨 탈수소효소는 3 개의 서브유닛으로 구성되어 있으며, 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 75 kDa 분자량의 탈수소효소 서브유닛인 제 1 서브유닛, 50 kDa 분자량의 시토크롬 인 제 2 서브유닛, 그리고 솔비톨 탈수소효소의 안정성에 중요한 역할을 하는 29 kDa 분자량의 제 3 서브유닛으로 구성되어 있는 막결합형 솔비톨 탈수소효소이다. 그리고 솔비톨 탈수소효소의 유전자는 2265 bp를 갖는 제 1 서브유닛과 1437 bp를 갖는 제 2 서브유닛을 포함하며, 이들 서브유닛은 제한효소 I으로 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편내에 연결되어 있다.

대표도

도5a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 pH 5 및 pH 6의 초산완충액을 이용한 DEAE-TSK 컬럼 크로마토 그래피를 나타낸 것이다.

도 2는 DEAE-TSK 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리된 피크 I과 피크 II의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 글루코노박터 서브옥시단스의 솔비톨 탈수소효소 제 1 서브유닛의 아미노 말단을 포함하는 1.53 kb DNA 절편(#SDH 2-1)이 포함된 람다 GEM 5-1의 제한효소 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 람다 GEM 5-1을 제한효소 I으로 절단한 5.7 kb DNA 절편에 있어서, 여러 종류의 제한효소로 절단하여 제조한 S1, S2 및 S3 DNA 단편의 위치를 나타낸 것이다.

도 5는 제한효소 I으로 절단한 5.7 kb DNA 절편내의 염기서열을 나타낸 그림이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 글루코노박터 서브옥시단스()의 솔비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase) 및 이의 유전자에 관한 것이다.

솔비톨 탈수소효소는 솔비톨을 솔보스로 전환시키는 반응의 촉매로 작용하여, 비타민 C 및 글론산의 전구체로 활용되는 솔보스의 제조와 관련된 효소로 알려져 있다. 솔비톨로부터 솔보스를 제조하는 공정은 글루코노박터 서브옥시단스, 아세토박터 자일리눔()과 같은 초산균에 의해 수행되며, 통상의 온도에서 24 시간 이내에 96 내지 99%의 전환이 이루어진다(Liebster, J., 50, 395(1956)).

글루코노박터 속에서 발견되는 솔비톨 탈수소효소는 그 조효소의 특이성에 따라 NAD-의존성, NADP-의존성 그리고 NAD(P)-비의존성 솔비톨 탈수소효소로 분류되며, 이 가운데 직접적으로 산업적인 솔보스 전환에 관여하는 것은 NAD(P)-비의존성 효소인 것으로 알려져 있다(Cummins, J. T. ., 224, 323; 226, 301(1957)).

본 발명자 등은 이와 같이 솔비톨의 솔보스로의 전환에 관여하는 대표적인 초산균인 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 원형질막에 결합되어 있는 막결합형 솔비톨 탈수소효소를 정제하여 분석한 결과, 이미 정제 및 효소특성이 알려진 글루코노박터 서브옥시단스 IFO 3254 균주 유래의 FAD 요구성 솔비톨 탈수소효소(Shinagawa, E. , 46, 135(1982))와 조효소 요구성 등이 다른 새로운 솔비톨 탈수소효소를 발견하였는데, 이 효소는 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하며 3 개의 서브유닛으로 구성되어 있다(Choi ., 125, 45(1995)).

즉, SYP 배지(솔비톨 5%, 박토-펩톤 1%, 효모엑기스 0.5%)에서 배양하여 얻은 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111) 균체를 10 mM 초산완충액(pH 5.0)에 현탁, 파쇄하여 얻은 상등액을 초원심분리하여 원형질막 분획을 회수하였다. 1.5% n-옥틸글루코시드(베링거만하임사)를 첨가하여 가용화시킨 원형질막 분획을 CM-TSK 650 (S)(Merck사), DEAE-TSK 650 (S)(Merck사), Mono-S(Pharmacia사) 및 Superose 12(Pharmacia사)와 같은 일련의 컬럼을 이용하여 NAD(P)-비의존성 솔비톨 탈수소효소를 정제하였다. 이와 같이 정제된 효소는 솔비톨, 만니톨, 리비톨 등 여러 폴리올을 각각 100%, 68%, 70% 전환시키는 등 광범위한 기질에 대해 활성을 나타낸다. 특히, 본 효소는 피롤로퀴놀린 퀴논 첨가시 활성이 9배 정도 증가하는 등, 조효소로서 피롤로퀴놀린 퀴논을 요구하며 형광스펙트럼 결과 정제된 효소가 피롤로퀴놀린 퀴논을 조효소로 포함함을 알 수 있었고, 흡광 스펙트럼 결과 이 효소는 시토크롬 을 가지는 것을 알 수 있었다. 정제된 효소는 pH 4.3의 산성조건에서 전기영동(Reisfeld, R. A., 195, 281(1962))하여 활성염색하면 단일 밴드를 형성하였고, 12.5% SDS-PAGE 상에서 75, 50 및 14 kDa 분자량을 가진 세 서브유닛으로 구성되어 있는 것으로 나타났는데, 이를 각각 분자량이 큰 순서대로 제 1 서브유닛, 제 2 서브유닛 및 제 3 서브유닛으로 명명하였다(Choi ., 125, 45(1995)).

그러나 좀 더 상세한 실험 결과, 29 kDa 분자량의 또 다른 서브유닛이 솔비톨 탈수소효소의 안정성에 매우 중요한 역할을 하는 것을 알게 되었다. 즉, DEAE-TSK 컬럼을 사용한 정제시의 단백질 분리능을 향상시키기 위하여 여러 pH 조건을 조사하던 중, pH 6.0에서 솔비톨 탈수소효소 활성을 가지는 피크가 급격히 효소활성을 상실하는 피크와 효소활성을 안정적으로 유지하는 피크의 두 피크로 분리되는 것을 발견하였다. 효소활성이 안정적으로 유지되는 피크는 급격히 효소활성을 상실하는 피크와는 달리 29 kDa 분자량의 서브유닛을 추가로 가지고 있음을 알게 되었으며, 이 서브유닛을 제 3 서브유닛으로 재명명하였다. 즉, 14 kDa 분자량의 제 3 서브유닛은 다른 서브유닛과의 상대적 양 등을 감안할 때 진정한 서브유닛인지가 불확실하다.

이하 29 kDa 분자량의 제 3 서브유닛을 가지는 정제효소를 사용하여 솔비톨 탈수소효소의 특성을 좀 더 자세히 조사하였다.

솔비톨 탈수소효소는 솔비톨을 기질로 사용하였을 때의 미카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 상수는 $K_m=120 \text{ mM}$, $V_{max}=3.9 \times 10^{-5} \text{ M/min}$ 으로 조사되었다. 또한, 솔비톨 탈수소효소의 전자수용체로 디클로로 페놀 인도페놀(dichlorophenol indophenol: DCIP)이나 페리시아나이드(ferricyanide)가 효과적으로 작용하였고, 전자매개체로서 페나진메소설페이트(phenazine methosulfate: PMS)를 첨가할 경우 그 활성의 증가를 나타내었다. 정제된 효소는 칼슘 또는 마그네슘 이온에 의해 상당한 활성의 증가를 나타내는 반면, 구리 이온은 심한 저해현상을 나타내었다.

그러나, 솔비톨 탈수소효소는 원형질막에 결합하여 존재하고 있고, 그 회수율이 0.05% 정도에 불과하므로 이와 같은 추출, 정제에 의해 얻은 효소를 산업적으로 활용하는 데는 어려움이 많다는 문제점이 있다.

따라서, 본 발명자들은 비타민 C 및 글루콘산의 필수적인 전구체로 활용되는 솔보스의 생산에 필요한 효소인 솔비톨 탈수소효소를 대량생산할 수 있는 방법을 연구하던 중, 특히 산업적으로 중요한 원형질막에 존재하는 솔비톨 탈수소효소를 글루코노박터 서브옥시단스 균주로부터 분리, 정제하여 그 특성을 규명하여 정제된 효소는 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 75 kDa 분자량의 탈수소효소 서브유닛인 제 1 서브유닛과 시토크롬 인 50 kDa 분자량의 제 2 서브유닛, 그리고 솔비톨 탈수소효소의 안정성에 중요한 역할을 하는 29 kDa 분자량의 제 3 서브유닛을 가지는 막결합형 솔비톨 탈수소효소임을 알았으며 각 서브유닛의 아미노말단 아미노산 서열을 결정하였다. 그리고 솔비톨 탈수소효소의 유전자 클로닝하여 그 DNA 염기서열을 해독함으로써 제 1 서브유닛과 제 2 서브유닛에 대한 DNA 염기서열을 결정할 수 있게 되었다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 글루코노박터 서브옥시단스()의 원형질막에 존재하는 솔비톨 탈수소효소 및 이의 유전자를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적에 따라, 본 발명에서는 75 kDa의 제 1 서브유닛(subunit), 50 kDa의 제 2 서브유닛 및 29 kDa의 제 3 서브유닛을 포함하는, 글루코노박터 서브옥시단스()의 막결합형 솔비톨 탈수소효소 및 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 제한효소 I에 의해 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편에 포함되는 솔비톨 탈수소효소 유전자를 제공한다.

글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 원형질막으로부터 일련의 컬럼을 이용하여 솔비톨 탈수소효소를 분리 정제한다. 정제된 효소의 여러 생화학적 특성을 규명하고, 각 서브유닛을 순수분리한 후 아미노산 서열 분석기(Applied Biosystems사, 477A)를 이용하여 각 서브유닛의 아미노말단 서열을 결정한다.

결정된 제 1 서브유닛의 아미노말단 아미노산 서열을 토대로 이에 대한 코돈을 활용하여 프라이머 1과 프라이머 2를 합성한다. 글루코노박터 서브옥시단스로부터 추출한 게놈 DNA를 플라스미드 pBluescript SK(Staratagene사)에 연결하고 프라이머 1과 2를 이용하여 SSP-PCR 방법에 따라 30 사이클을 실시하여 1.53kb 크기의 #SDH2-1 조각을 분리한다. 이 조각은 제 1 서브유닛의 아미노말단 일부를 포함한다. 이 #SDH2-1 조각을 플라스미드 pBluescript SK에 연결하고, 이를 이용하여 대장균을 형질전환시킨 후, 형질

전환체를 배양하고 알칼리법으로 플라스미드를 추출한다.

솔비톨 탈수소효소의 유전자 라이브러리를 제조하기 위하여, 우선 글루코노박터 서브옥시단스로부터 추출한 게놈 DNA에 제한효소를 처리하여 람다 GEM-11(Promega사)에 클로닝한 다음, 라벨링된 #SDH2-1을 이용하여 상기 라이브러리로부터 람다 GEM 5-1을 분리한다. 이어서, 람다 GEM 5-1을 제한효소로 절단하여 약 5.7 kb 크기의 DNA 절편을 얻어서 DNA 서열을 분석한다. 이 절편을 제한효소 I과 I, 제한효소 I과 II 및 제한효소 I과 I으로 절단하여 각각 S1 DNA 단편, S2 DNA 단편 및 S3 DNA 단편을 제조한다. 수득된 S1, S2 및 S3의 각 DNA 단편들을 ExoIII-멍빈(Mungbean)(Stratagene사)을 이용하여 DNA 염기서열을 해독할 수 있다.

이와 같이 해독된 염기서열을 분석하면, 글루코노박터 서브옥시단스의 솔비톨 탈수소효소에는 2265 bp로 구성되어 있고 79,139 Da의 분자량을 갖는 제 1 서브유닛 및 1437 bp로 구성되어 있고 51,368 Da의 분자량을 갖는 제 2 서브유닛이 제한효소 I으로 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편내에 연결되어 존재한다는 것을 알 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀 더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 제한되는 것은 아니다.

[실시예]

(단계 1) 제 3 서브유닛의 분리 및 기능

글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111) 균주로부터 솔비톨 탈수소효소의 정제과정 중 음이온 교환컬럼인 DEAE-TSK의 pH 변화에 따른 단백질 분리능 및 효소활성도의 안정성에 관하여 조사하였다.

CM-TSK 컬럼을 통해 부분정제된 시료를 pH 5 또는 pH 6의 10 mM 초산완충액을 이용하여 DEAE-TSK 컬럼 크로마토그래피를 수행한 뒤 활성을 나타내는 각 분획의 효소활성을 측정하였다.

도 1에서 보는 바와 같이, pH 6으로 용출한 경우(b)가 pH 5를 사용한 경우(a) 보다 그 분해능이 훨씬 더 높았으며, 효소 활성을 보이는 피크 I과 피크 II가 순수하게 분리되었다.

두 피크가 완전히 분리된 pH 6으로 용출한 DEAE-TSK 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리된 분획들의 SDS-PAGE 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2a는 첫 번째 활성 피크인 피크 I에서 용출된 분획들로서, 제 M 열은 표준분자량 단백질을 나타낸 것이고, 제 1 내지 4 열에서 보듯이, 제 1 서브유닛과 제 2 서브유닛인 75 kDa와 50 kDa 밴드는 관찰되지만 제 3 서브유닛인 29 kDa의 밴드가 나타나지 않았으며, 이 경우에는 용출 후 1 시간 후에는 약 10 배 이상의 효소활성이 감소되는 것을 알 수 있었다. 도 2b는 두 번째 활성 피크인 피크 II에서 용출된 분획들로서, 제 M 열은 표준분자량 단백질을 나타낸 것이고, 제 5 내지 8 열에서 보듯이, 두 서브유닛 외에도 제 3 서브유닛인 29 kDa 밴드가 존재하는 피크 II의 경우에는 효소활성이 그대로 유지되는 것을 확인하였다. 결국, 제 3 서브유닛인 29 kDa 분자량의 단백질은 솔비톨 탈수소효소의 작용 기작과 밀접한 연관이 있는 전자전달계에 관여할 가능성이 있으며, 솔비톨 탈수소효소의 활성도를 안정화시키는 데에 기여하는 것으로 사료된다.

(단계 2) 제 1 서브유닛 및 제 3 서브유닛의 아미노말단 아미노산 서열 결정

글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 갖는 솔비톨 탈수소효소를 분리 정제하고(Choi, .. 125, 45(1995)), 정제된 효소의 각 서브유닛을 순수분리한 뒤 아미노산 서열 분석기(Applied Biosystems사, 477A)를 이용하여 하기 서열 1의 제 1 서브유닛 및 하기 서열 2의 제 3 서브유닛의 아미노말단 서열을 결정하였다.

[서열 1]

Glu-Asp-Thr-Gly-Thr-Ala-Ile-Thr-Asn-Ala-Asp-Gln-His-Pro-Gly

[서열 2]

Ala-Gly-Thr-Pro-Leu-Lys-Ile-Gly-Val-Thr-Phe-Gln

(단계 3) 프라이머 제작 및 1.53 kb DNA 절편의 분리

결정된 제 1 서브유닛의 아미노말단 아미노산 서열을 토대로 이에 대한 코돈을 활용하여 프라이머 1(5'-CCGGAATTC GAA(G) GAT(C) ACI GGI ACI GC-3') 및 프라이머 2(5'-ATT(C,A) ACI AAT(C) GCI GAT(C) CAA(G) CAT(C) CC-3')를 합성하였다.

타케다와 시미즈의 방법(Takeda Shimizu, .. 72, 1(1991))에 따라 글루코노박터 서브옥시단스로부터 추출한 게놈 DNA를 제한효소 HI으로 부분절단하였다. 이어서 플라스미드 pBluescript SK(Stratagene사)를 I과 HI으로 절단한 후, HI 위치에 부분절단된 게놈 DNA를 연결하였다.

상기 프라이머 1과 프라이머 2, 및 T7 프라이머를 이용하여 SSP-PCR 방법(White, B., SSP-PCR and genome walking, in PCR protocols, Humana Press, 15, 339(1993))에 따라 30 회 실시한 후, 1.53 kb 크기의 절편 #SDH2-1을 분리하였다.

분리된 #SDH2-1 절편을 플라스미드 pBluescript SK에 연결하고 이를 이용하여 대장균 DH5 α 를 형질전환시킨 후, 앵피실린 100 μ g/mL이 첨가된 LB 배지에서 배양하였다. 이어서 알칼리법(Sambrook, J., CSH Press, p.1.25 (1989))으로 플라스미드를 추출하여 이를 프라이머 1 및 프라이머 2와 반응시켰을 때 양성으로 반응하였으며, 이 #SDH2-1 절편은 제 1 서브유닛의 아미노말단 일부를 포함하지만 카복시말단 부분을 갖고 있지 않았다.

(단계 4) 1.53 kb DNA 절편을 이용한 15 kb DNA 절편의 분리

#SDH2-1을 DIG(베링거만하임사)으로 라벨화하였다(Ausubel, F. Protocols in Mol. Biol., Wiley Sons Inc., p.2.4.1 (1987)).

솔비톨 탈수소효소의 유전자 라이브러리를 제조하기 위하여, 상기 (단계 3)과 같은 방법으로 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)로부터 게놈 DNA를 추출하고 이를 제한효소 3A로 부분절단한 15 내지 23 kb 크기의 DNA를 람다 GEM-11(Promega사)의 HI 위치에 클로닝하였다.

상기 라벨링된 #SDH2-1을 이용하여 상기 라이브러리로부터 15 kb 크기의 람다 GEM 5-1을 분리하였다.

도 3은 람다 GEM 5-1의 제한효소 지도를 나타낸 것이다.

(단계 5) 15 kb DNA 절편 중 I 절단부위의 염기서열 해독

람다 GEM 5-1을 제한효소 I으로 절단하여 #SDH2-1을 포함하는 약 5.7 kb 크기의 DNA 절편을 얻었다.

염기서열 해독을 용이하게 하기 위하여, 5.7 kb DNA 절편을 각각 제한효소 I과 I으로 절단한 S1 DNA 단편, 제한효소 I과 II로 절단한 S2 DNA 단편 그리고 제한효소 I과 I으로 절단한 S3 DNA 단편을 제조하였다.

도 4는 람다 GEM 5-1을 제한효소 I으로 절단하여 얻은 #SDH2-1을 포함하는 약 5.7 kb 크기의 DNA 절편에 있어서, 여러 종류의 제한효소로 절단하여 제조한 S1, S2 및 S3 DNA 단편의 위치를 나타낸 것이다.

각 S1, S2 및 S3 DNA의 염기서열을 ExoIII-명빈(Mungbean)(Stratagene사)을 이용하여 해독하였다.

도 5는 제한효소 I으로 절단한 5.7 kb DNA 절편내의 염기서열을 나타낸 것이다.

여기에서 보듯이, 샤인-달가노 서열인 'AGGA'는 651~654 bp에 위치하고, 제 1 서브유니트의 시그널 서열은 665~766 bp에 위치하며, 이 시그널 펩티드가 잘려진 제 1 서브유니트를 코딩하는 서열은 767~2926 bp에 존재하였다. 이것은 754 개의 아미노산을 코딩하며, 그 아미노산 서열이 제 1 서브유니트의 아미노산 서열분석 결과 밝혀진 15 개의 아미노산 서열과 일치하는 것을 알 수 있었다. 이어서 2950~2953 bp에 샤인-달가노 서열(AGGA)이 존재하고, 제 2 서브유니트는 2964~4400 bp에 위치하였으며, 이것은 478 개의 아미노산을 코딩하며, 정지코돈에 이어서 역위 반복서열이 여러개 존재하였다. 또한, 이상의 염기서열로부터 유추된 활성형 단백질의 분자량은 제 1 서브유니트는 79 kDa, 제 2 서브유니트는 51 kDa으로써, 동효소의 전기영동상 결과인 75 kDa 및 50 kDa 분자량과 유사함을 알 수 있었다.

그리고 세균내에서 발견되는 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 탈수소효소들의 아미노말단과 카복시말단 부위에서 특징적으로 일치하여 나타나는 서열들이 제 1 서브유니트 내에 존재함을 알 수 있었고, 아미노말단 부위에 존재하는 특징적인 일치서열은 하기 서열 3에 나타내었고, 카복시말단 부위에 존재하는 특징적인 일치서열은 하기 서열 4에 나타내었다. 이는 제 1 서브유니트가 조효소로 피롤로퀴놀린 퀴논을 포함하고 있음을 증명하는 또 다른 증거라 할 수 있다(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이다).

[서열 3]

[Asp/Glu/Asn] -Trp-Xaa-Xaa-Xaa-Gly- [Arg/Lys] -Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa- [Phe/Tyr/Trp] -Ser-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa- [Leu/Ile/Val/Met] -Xaa-Xaa-Xaa-Asn-Xaa-Xaa-Xaa-Leu- [Arg/Lys]

[서열 4]

Trp-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Asp-Xaa-Xaa-Xaa- [Asp/Asn] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] -Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa- [Ser/Thr/Ala] -Pro

이 외에도 하기 서열 5의 헴(heme) 결합서열이 제 1 서브유니트와 제 2 서브유니트 내에 하나 또는 세 개가 존재함을 확인하였다(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이고, Yaa는 Xaa와는 다른 임의의 아미노산이다).

[서열 5]

Cys-Xaa-Yaa-Cys-His

DNA 염기서열의 동일성을 분석한 결과, 제 1 서브유니트의 DNA 염기서열은 피롤로퀴놀린 퀴논을 조효소로 포함하는 여러 탈수소효소와 높은 유사성을 보였는데, 특히 아세트박터 폴리오제네스()와 아세트박터 아세티()의 알코올 탈수소효소와 각각 77%(Tamaki, T. , 1088, 292(1991))와 70%(Inoue, T. , 171, 3115(1989))의 동일성을 보였다. 제 2 서브유니트의 DNA 염기서열은 글루코노박터 서브옥시단스 IFO 12528의 시토크롬 -553(Takeda and Shimizu, , 72, 1(1991))의 서열과 가장 높은 동일성을 나타냈는데, DNA 염기상 동일성은 83%, 아미노산 서열상 동일성은 88%로 나타났다.

이와 같이 제 1 서브유니트와 제 2 서브유니트는 하나의 오페론에 위치함을 확인하였다. 한편 29 kDa를 코딩하는 제 3 서브유니트는 아직 발견하지 못하였다.

발명의 효과

이상에서 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 슬비를 탈수소효소의 유전자는 2265 bp에 의해 코드되는 제 1 서브유니트, 1437 bp에 의해 코드되는 제 2 서브유니트를 포함하며, 이들 서브유니트는 제한효소 I으로 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편내에 연결되어 있음을 알 수 있다. 이들 염기서열은 GenBank에 제 U26263 호로서 1995 년 5 월 4 일에 등록되어 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1. 75 kDa의 제 1 서브유니트(subunit), 50 kDa의 제 2 서브유니트 및 29 kDa의 제 3 서브유니트를 포함하는, 글루코노박터 서브옥시단스()의 막결합형 슬비를 탈수소효소.

청구항 2. 제 1 항에 있어서,

제 1 서브유니트 내에 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 슬비를 탈수소효소.

청구항 3. 제 1 항에 있어서,

제 1 서브유니트가 하기 서열 1의 아미노말단 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 슬비를 탈수소효소.

[서열 1]

Glu-Asp-Thr-Gly-Thr-Ala-Ile-Thr-Asn-Ala-Asp-Gln-His-Pro-Gly

청구항 4. 제 1 항에 있어서,

제 3 서브유니트가 하기 서열 2의 아미노말단 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 슬비를 탈수소효소.

[서열 2]

Ala-Gly-Thr-Pro-Leu-Lys-Ile-Gly-Val-Thr-Phe-Gln

청구항 5. 제 2 항에 있어서,

제 1 서브유닛 내에 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 솔비톨 탈수소효소의 아미노말단 부위에서 하기 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이다).

[서열 3]

Xaa-Leu- [Arg/Lys]

청구항 6. 제 2 항에 있어서,

제 1 서브유닛 내에 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)을 조효소로 포함하는 솔비톨 탈수소효소의 카르복시말단 부위에서 하기 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이다).

[서열 4]

Trp-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Tyr-Asp-Xaa-Xaa-Xaa- [Asp/Asn] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - [Leu/Ile/Val/Met/Phe/Tyr] - Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa- [Ser/Thr/Ala] -Pro

청구항 7. 제 1 항에 있어서,

제 1 서브유닛 및 제 2 서브유닛이 하기 서열 5의 헴(heme) 결합서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소(여기에서 Xaa는 임의의 아미노산이고, Yaa는 Xaa와는 다른 임의의 아미노산이다).

[서열 5]

Cys-Xaa-Yaa-Cys-His

청구항 8. 글루코노박터 서브옥시단스(KCTC 2111)의 제한효소 I에 의해 절단되는 5.7 kb 크기의 DNA 절편에 포함되는 솔비톨 탈수소효소 유전자.

청구항 9. 제 8 항에 있어서,

솔비톨 탈수소효소 유전자가 2265 bp의 제 1 서브유닛 및 1437 bp의 제 2 서브유닛을 포함하는 솔비톨 탈수소효소 유전자.

청구항 10. 제 9 항에 있어서,

제 1 서브유닛이 하기 서열 6의 영기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소 유전자.

[서열 6]

```

665 ATGTTTCTG GTCTACTGAC GCCGATCAAC GTTACGAAGA AGCGOCTTCT GGGTTGCGCT
725 GCTGCTCTGG CATTCTGCGC CACCTCTCCT GTGCCCCTGG CTGAGGACAC AGGAACAGCC
785 ATTACAAACG CCGACCAGCA TCCGGGTGAC TGGATGAGCT ATGGCCGGAC CTATTCOGAG
845 CAGCGCTACA GCCCGCTGGA TCAGATCACC AAGGACAATG CGAGCAATCT GAAGCTGGCA
905 TGGCACTACG ATCTGGATAC CAACCGTGGT CAGGAAGGTA CGCCOCTGAT CGTTGATGGC
965 GTCATGTACG CCACCACAAA CTGGAGCAAG ATGAAGGCTC TGGATGCAGC TACGGGCAAG
1025 CTGCTGTGGT CTTACGATCC AAAGGTTCCA GGCAACATCG CCGACCGCGG CTGCTGCGAT
1085 ACGGTCAACC GTGGTCAGC CTACTGGAAC GGCAAGTCT ATTTCCGGAC CTTCCGACGGT
1145 CGCTGATTG CCCTGGATGC CAAGACCGGC AAGCTGGTCT GGAGCGTCTA TACGGTTCCC
1205 AAGGAAGCGC AGCTGGGTCA CCAGCGCTCC TACACGGTTG ACGGTGCTCC CCGTATCGCC
1265 AAGGGCAAGG TCATCATCGG CAACGGCGGT GCAGAGTTCG GCGCCCGTGG CTTCTGTAGC
1325 GCGTATGACG CTGAAACGGG AAAGATGGAC TGGCGCTTCT TCACCGTTCC GAACCTGAC
1385 AACAAAGCCG ACGGCGCAGC GTCTGACGAC GTGCTGATGT CCAAGGCTTA TCCGACATGG
1445 GGCAAGGGCG GCGCGTGAA GCAGCAGGGC GGTGGCGGTA CCGTCTGGGA TTCGCTGATC
1505 TATGACCCTG TAACGGATCT CGTCTATCTG GCGCTCGGTA ACGGCTCGCC ATGGAACCTAC
1565 AAGTTCCGTT CTGAAGGAAA AGGCAACAAC CTCTTCCTCG GCAGCATCGT GGCCATCAAT
1625 CCTGACACCG GCAAATACGT CTGGCATTTC CAGGAAAGCG CAATGGACCA GTGGGATTAT
1685 ACCTCGGTTG AGCAGATCAT GGCCCTCGAC ATGCCGGTCA ATGGCGAAAT GCGCCATGTG
1745 CTCGTGCATG CGCCGAAGAA CGGCTTCTTC TATATCATTG ATGCCAAGAC CGGTAAGTTC
1805 ATCTCCGGCA AGCGGTACAC CTACGAGAAC TGGGCCAATG GCCTCGATCC GGTAAACGGGT
1865 CGTCCGAAC TACAATCCAGA TGCTCTCTGG ACGCTGAACG GCAAGCCCTG GTACGGCATC
1925 CCCGCGATC TGGGTGGTCA TAACTTCGCT GCCATGGCTT ACAGCCACCA GACGAAGCTG
1985 GTTTACATTC CCGCCAGCA GGTTCCTTC GTTTACGATC CGCAGAAAGG TGGCTTCAAG
2045 GCTCACCACG ACAGCTGGA CTTTGGCCTC GACATGAACA AGATCGGCCT GCTTGATGAC
2105 AACGATCCAC AGCACAAGGC TGACAAGGCC CAGTTCCTGA AGGATCTGAA GGGCTGGATC
2165 GTTGCAATGG ATCCGCAGAA GCAGCAGGCA GCCTTCACGG TTGACCACAA GGGTCCGTGG
2225 AATGGCGGTC TTCTGGCAAC GGCTGGTGGC GTTCTGTTC AGGGTCTGCG CAACGGTGAG
2285 TTCCACGCC TACGACGCGAC GACGGGTAAG GATCTCTTCA CCTTCCAGC ACAGAGCGCC
2345 ATCATTGCC CGCCAGTCAC CTACACAGCC AACGGCAAGC AGTATGTTGC GGTGGAAGTG
2405 GGCTGGGGCG GTATCTATCC GTTCTTCTG GCGGGCGTAG CCCGTACGTC CGGCTGGACC
2465 GTCAACCACT CCCGGATCAT CGCGTTCGCT CTGGACGGCA ACGACAAGCT GCCAGCCAAG
2525 AACGAGCTCG GCTTCGTTCC AGTGAAGCCG CCTGAGAAAT GGGATGAAGC CAAGATCAAG
2585 GACGGCTACT TCAGTTTCCA GACCTATTGC GCAGCCTGCC ATGGTGACAA CGGTATCTCC
2645 GCGGTGTTT TCCAGACCT GCGCTGGTCC GGTGCGATCC GTGGAGAGGA GAAGTTCTAC
2705 AAGCTCGTCG GCAAGGGTGC TCTAACGGCC TACGGTATGG ACCGTTTGA CACGTCCATG
2765 TCGCCAGCTG AAATCGAAGA CATCCGCAAC TTCCTTGTGA AGCGCGCCAA CGAGTCTTAC
2825 GCAGACGAAG TCAAGGCCCG AAAGAATGAG GCAGGCGTCC CTAACGGCGA ATTCTCAAC
2885 GTCCCTCAGG GTTCGGTTGC GCCTGCAACG CCGACCATC CGTAA

```

청구항 11. 제 9 항에 있어서,

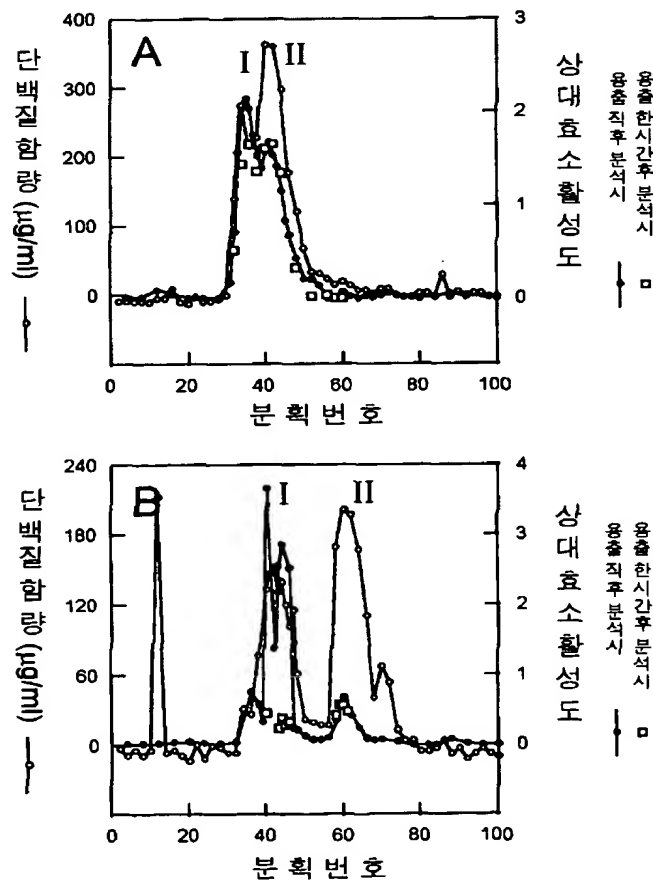
제 2 서브유니트가 하기 서열 7을 포함하는 것을 특징으로 하는 솔비톨 탈수소효소 유전자.

[서열 7]

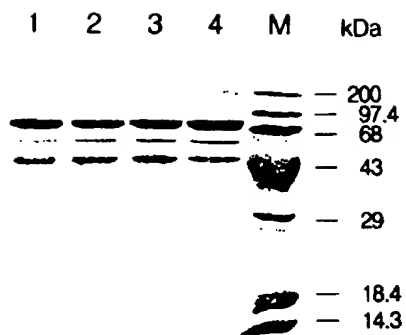
2964 ATGCTCAAGG CATTAACTCG GGACAGACTG GTATCTGAGA TGAAACAGGG ATGGAATAC
 3024 GCGGCCGAG TCGGCCTCAT GGCAGTGTCT TTCGGTGCTG CCCAAGCCCA GGACGCTGAT
 3084 GACGCCCTGA TTCAGCGCGG TGCCTACGTG GCGCGCCTGT CTGACTGCGT TGCCTGCCAT
 3144 ACCGCACTAC ACCGCCAGCC TTTTGCTGGT GGTCTGGAGA TCAAGAGCCC GATCGGCACG
 3204 ATCTACTCCA CCAACATCAC GCCTGACCCG AAATACGGTA TCGGCAACTA TACACTCGAA
 3264 GATTTACGA AGGCGATCCG TAAGGGTATC CGCAAGGACG GCGCGACGGT TTATCCGGCC
 3324 ATGCCGTATC CTGAGTTCGC TCGCCTGTCT GATGACGACA TCAAGGCCAT GTATGCTTTC
 3384 TTCATGCATG GCGTGAAGCC GGTGCGCCTT CAGAACAAGC AGCGGACAT CTCCTGGCCG
 3444 ATGAACATGC GCTGGCCGTT GGCCATCTGG CGCGCGATGT TTGTTCCGAC TGTACACCA
 3504 GGCCTCGACA AGAGCATCTC CGATCCGGAA GTGGCGCGTG GCGAATACCT CGTGAATGGC
 3564 CCAGGCCATT GTGGCGAGTG TCATACGCCC CGTGCCATGG CCATGCAGGT CAAGGGCTAT
 3624 ACGGCCAAGG ACGGCAACGC TTACCTCTCC GGTGGCGCAC CGATCGACAA CTGGATTGCT
 3684 CCCAGCCTGC GTAGCAATAG CGACACGGT CTGGGTCGCT GGTCTGAAGA CGACATTGCC
 3744 GAGTTCTCTA AGAGCGGCCG TATCGACCAT TCTGCCGTCT TCGGTGGCAT GGCTGACGTG
 3804 GTGGCCTACA GCACCCAGCA CTGGACCGAC GACGATCTGC ACGCAACGGC CAAGTACCTG
 3864 AAGAGCATGC CGGCCGTTCC GGAAGGCAAA AACCTGGGTC AGGATGACGG CAAGGCCACG
 3924 GCCCTGCTCG AAGCCGGTGG CAAGGTGAT GCAGGCGCAG AGGTTTACCT CCACAATGT
 3984 GCCATCTGCC ATATGAACGA TGGCACTGGT GTCAACCGCA TGTTCGCGCC GCTGGCTGGC
 4044 AACCCGCTCG TCATCACGGA CAATGCAACC TCAATGGCCA ACATCGTGAC ATTCGCGCGT
 4104 ATTCTGCCTC CGACGAATAC GCGGCCATCT GCTGTTGCCA TGCCGGGCTT CCGCGATCAT
 4164 CTGTCTGACC AGCAGATCGC CGATGTTGTG AACTTCATGC GCAAGAGCTG GGGCAACCAG
 4224 GCTCCGGGAA CCCTGTCTGC CTCGGATATC CGCAAGCTCC GCACATCGGG TACTGCGGTT
 4284 TCCACGGCCG GCTGGAACGT CTCTTCCAAG GGCTGGATGG CCTACATGCC GCAGCCTTAT
 4344 GCGAAGGCT GGACCTTCTC CCGCAGACA CACACGGCG TGGATCAGGC TCAGTAA

도면

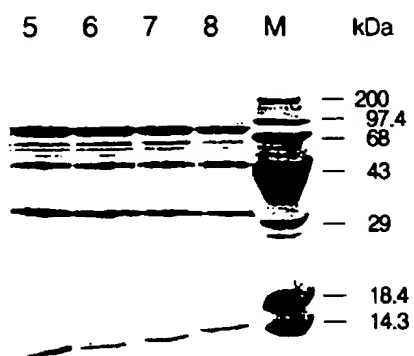
도면1



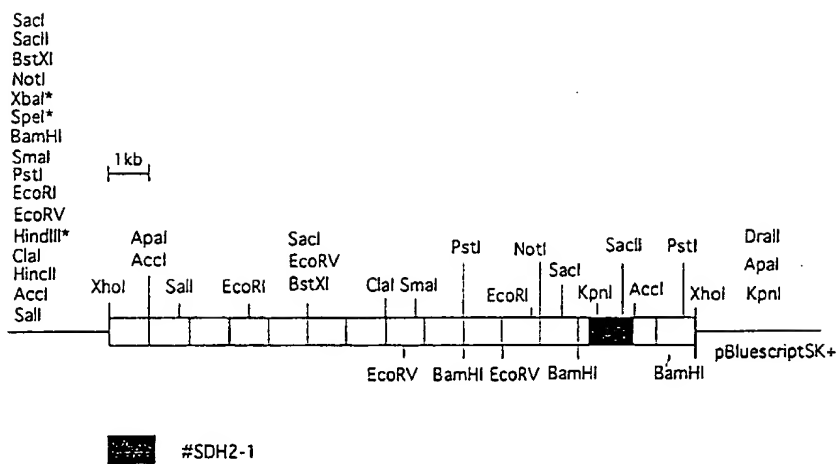
도면2a



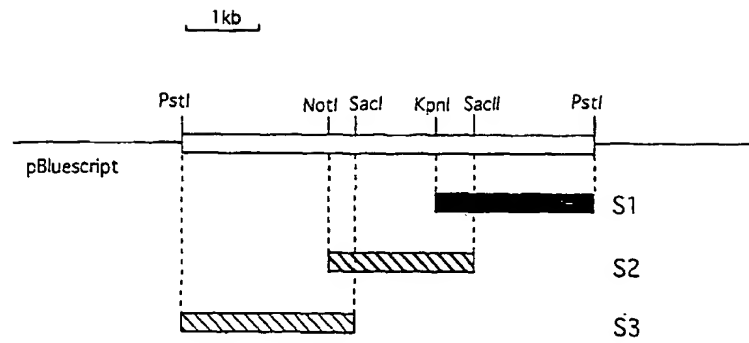
도면2b



도면3



도면4



도면5a

```

10      20      30      40      50      60
CGAGAACGGA AGCCCGCTGA AATCGACCCG TTCCCCATCA AAATACTTTT CGAGAAGATC

70      80      90      100     110     120
ACGAACCTTC ACCAGGAGCG GCGTCTCTTC CTGATCGCGC CCCACACCCC AATCGAGAGC

130     140     150     160     170     180
AACAAATACGC CCGTCATCTT CACTGATGGT CAGGGCTCCG AGATGGGAAT GGCAGGAAAG

190     200     210     220     230     240
CTGTGGCATA CAGATACGCT GCCCCATCCC CCGGAAAGCG TCAATCATGC TTCCCTAAAA

250     260     270     280     290     300
GAGTCCCTGA GAAAAAATA CATGCGTGTC ACGCATATGC AGGGAGGCCG GTATTCTCAA

310     320     330     340     350     360
ATAACATATG GGATCATTTT TGTATGATT CATGAAATAT TACGCACTTT GTTGAGAAAC

370     380     390     400     410     420
TGCCATTTT TGTGTCAAAC CTGCGACAGA CACTAAAGCT GTTTTGGTTG TTTGGTTATT

430     440     450     460     470     480
AAGAATAATT CTCATGTAAT TAAGCGAGCG ATTTTACGCG GATAGTGCTC ACGGAGACGT

490     500     510     520     530     540
CAGAAGCCCA CGTTTCCGAC AAACAATAAA ATAAGCGAGT AGTAAGTTCA CGCGATGCTA

550     560     570     580     590     600
CGTTTTCAG ACGACTTGGA GAAACTGAGG AGCACCTAGG CACCCACAGA GCGCGCTATC

610     620     630     640     650     660
AGGACTTGGA TTACGTCTGA ATACCATTA CAGGAACAGT CTTTGCAAAA AGGACAGTCG

670     680     690     700     710     720
GATCATGGTT TCTGGTCTAC TGACGCCGAT CAACGTTACG AAGAAGCGCC TTCTGGGTTG

730     740     750     760     770     780
CGCTGCTGCT CTGGCATTCT GCGCCACCTC TCCTGTCGCC CTGGCTGAGG ACACAGGAAC

790     800     810     820     830     840
AGCCATTACA AACGCCGACC AGCATCCGGG TGA CTGGATG AGCTATGGCC GGACCTATTG

850     860     870     880     890     900
CGAGCAGCGC TACAGCCCGC TGGATCAGAT CACCAAGGAC AATGCCGAGCA ATCTGAAGCT

910     920     930     940     950     960
GGCATGGCAC TACGATCTGG ATACCAACCG TGGTCAGGAA GGTACGCCGC TGATCGTTGA

```

도면5b

970	980	990	1000	1010	1020
TGGCGTCATG	TACGCCACCA	CAAACTGGAG	CAAGATGAAG	GCTCTGGATG	CAGCTACGGG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CAAGCTGCTG	TGGTCTTACG	ATCCAAAGGT	TCCAGGCAAC	ATCGCCGACC	GCGGCTGCTG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGATACGGTC	AACCGTGGTG	CAGCCTACTG	GAACGGCAAA	GTCTATTTCC	GCACCTTCGA
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CGGTCGCCCTG	ATTGCCCTGG	ATGCCAAGAC	CGGCAAGCTG	GTCTGGAGCG	TCTATACGGT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TCCCAAGGAA	GCGCAGCTGG	GTCACCAGCG	CTCCTACACG	GTGACGGTG	CTCCCCGTAT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CGCCAAGGGC	AAGGTCATCA	TCGGCAACGG	CGGTGCAAGG	TTCGGCGCCC	GTGGCTTCGT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GACGGCGTAT	GACGCTGAAA	CGGGAAAGAT	GGACTGGCGC	TTCTTCACCG	TTCCGAACCC
1390	1400	1410	1420	1430	1440
TGACAACAAG	CCGGACGGCG	CAGCGTCTGA	CGACGTGCTG	ATGTCCAAGG	CTTATCCGAC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ATGGGGCAAG	GGCGGCGCGT	GGAAGCAGCA	GGCGGCTGGC	GGTACCGTCT	GGGATTGCT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GATCTATGAC	CCTGTAACGG	ATCTCGTCTA	TCTGGGCGTC	GGTAACGGCT	CGCCATGGAA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CTACAAGTTC	CGTTCGGAAG	GAAAAGGCAA	CAACCTCTTC	CTCGGCAGCA	TCGTGGCCAT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CAATCCTGAC	ACCGGCAAAT	ACGTCTGSCA	TTTCCAGGAA	ACGCCAATGG	ACCAGTGGGA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TTATACCTCG	GTTCAGCAGA	TCATGGCCCT	CGACATGCCG	GTCAATGGCG	AAATGCGCCA
1750	1760	1770	1780	1790	1800
TGTGCTCGTG	CATGCGCCGA	AGAACGGCTT	CTTCTATATC	ATTGATGCCA	AGACCGGTAA
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GTTTCATCTCC	GGCAAGCCGT	ACACCTACGA	GAAGTGGGCC	AATGGCCTCG	ATCCGGTAAC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
GGGTCGTCGG	AACTACAATC	CAGATGCTCT	CTGGACGCTG	AACGGCAAGC	CCTGGTACGG

도면5c

1930	1940	1950	1960	1970	1980
CATCCCCGGC	GATCTGGGTG	GTCATAACTT	CGCTGCCATG	GCTTACAGCC	CACAGACGAA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
GCTGGTTTAC	ATTCCCGCCC	AGCAGGTTCC	CTTCGTTTAC	GATCCGCAGA	AGGGTGGCTT
2050	2060	2070	2080	2090	2100
CAAGGCTCAC	CACGACAGCT	GGAACCTTGG	CCTCGACATG	AACAAGATCG	GCCTGCTTGA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
TGACAACGAT	CCACAGCACA	AGGCTGACAA	GGCCAGTTTC	CTGAAGGATC	TGAAGGGCTG
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GATCGTTGCA	TGGGATCCGC	AGAAGCAGCA	GGCAGCCTTC	ACGGTTGACC	ACAAGGGTCC
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GTGGAATGGC	GGTCTTCTGG	CAACGGCTGG	TGGCGTTCTG	TTCCAGGGTC	TCGCCAACGG
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TGAGTTCCAC	GCCTACGACG	CGACGACGGG	TAAGGATCTC	TTCACCTTCC	CAGCACAGAG
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CGCCATCATT	GCCCCGCCAG	TCACCTACAC	AGCCAACGGC	AAGCAGTATG	TTGCGGTTGA
2410	2420	2430	2440	2450	2460
AGTGGGCTGG	GGCGGTATCT	ATCCGTTCTT	CCTGGGCGGC	GTAGCCCGTA	CGTCCGGCTG
2470	2480	2490	2500	2510	2520
GACCGTCAAC	CACTCCCGGA	TCATCGCGTT	CGCTCTGGAC	GGCAACGACA	AGCTGCCAGC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
CAAGAACGAG	CTCGGCTTCG	TTCCAGTGAA	GCCGCCTGAG	AAATGGGATG	AAGCCAAGAT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CAAGGACGGC	TACTTCCAGT	TCCAGACCTA	TTGCGCAGCC	TGCCATGGTG	ACAACGGTAT
2650	2660	2670	2680	2690	2700
CTCCGGCGGT	GTCTTGCCAG	ACCTGCGCTG	GTCCGGTGCG	ATCCGTGGAG	AGGAGAAGTT
2710	2720	2730	2740	2750	2760
CTACAAGCTC	GTCGGCAAGG	GTGCTCTAAC	GGCCTACGGT	ATGGACCGTT	TCGACACGTC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CATGTCGCCA	GCTGAAATCG	AAGACATCCG	CAACTTCCTT	GTGAAGCGCG	CCAACGAGTC
2830	2840	2850	2860	2870	2880
CTACGCAGAC	GAAGTCAAGG	CCCGAAAGAA	TGAGGCAGGC	GTCCCTAACG	GCGAATTCTT

도면5d

2890	2900	2910	2920	2930	2940
CAACGTCCCT	CAGGGTTCGG	TTGCGCCTGC	AACGCCGGAC	CATCCGTAAC	GGGAAACCGT
2950	2960	2970	2980	2990	3000
CACGCTGAAA	GGAATGACGT	GACATGCTCA	AGGCATTAAC	TCGGGACAGA	CTGGTATCTG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
AGATGAAACA	GGGATGGAAA	TACGCGGCCG	CAGTCGGCCT	CATGGCAGTG	TCTTTCGGTG
3070	3080	3090	3100	3110	3120
CTGCCCCAAGC	CCAGGACGCT	GATGACGCCC	TGATTCAGCG	CGGTGCCTAC	GTGGCCCGCC
3130	3140	3150	3160	3170	3180
TGTCTGACTG	CGTTGCCTGC	CATACCGCAC	TACACGGCCA	GCCTTTTGCT	GGTGGTCTGG
3190	3200	3210	3220	3230	3240
AGATCAAGAG	CCCGATCGGC	ACGATCTACT	CCACCAACAT	CACGCCTGAC	CCGAAATACG
3250	3260	3270	3280	3290	3300
GTATCGGCAA	CTATACACTC	GAAGATTTC	CGAAGGCGAT	CCGTAAGGGT	ATCCGCAAGG
3310	3320	3330	3340	3350	3360
ACGGCGCGAC	GGTTTATCCG	GCCATGCCGT	ATCCTGAGTT	CGCTCGCCTG	TCTGATGACG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
ACATCAAGGC	CATGTATGCC	TTCTTCATGC	ATGGCGTGAA	GCCGGTCGCC	CTTCAGAACA
3430	3440	3450	3460	3470	3480
AGCAGCCGGA	CATCTCCTGG	CCGATGAACA	TGCGCTGGCC	GTTGGCCATC	TGGCGCGCGA
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TGTTTGTTCC	GACTGTCACA	CCAGGCCTCG	ACAAGAGCAT	CTCCGATCCG	GAAGTGCGCG
3550	3560	3570	3580	3590	3600
GTGGCGAATA	CCTCGTGAAT	GGCCCAGGCC	ATTGTGGCGA	GTGTCATACG	CCCCGTGGCA
3610	3620	3630	3640	3650	3660
TGGCCATGCA	GGTCAAGGCG	TATACGGCCA	AGGACGGCAA	CGCTTACCTC	TCCGGTGGCG
3670	3680	3690	3700	3710	3720
CACCGATCGA	CAACTGGATT	GCTCCAGGCC	TGCGTAGCAA	TAGCGACACG	GGTCTGGGTC
3730	3740	3750	3760	3770	3780
GCTGGTCTGA	AGACGACATT	GCCGAGTTCC	TGAAGAGCGG	CCGTATCGAC	CATTCTGCCG
3790	3800	3810	3820	3830	3840
TCTTCGGTGG	CATGGCTGAC	GTGGTGGCCT	ACAGCACCCA	GCACTGGACC	GACGACGATC

도면5e

3850	3860	3870	3880	3890	3900
TGCAAGCAAC	GGCCAAGTAC	CTGAAGAGCA	TGCCGGCCGT	TCCGGAAGGC	AAAAACCTGG
3910	3920	3930	3940	3950	3960
GTCAGGATGA	CGGCAAGGCC	ACGGCCCTGC	TCGAAGCCGG	TGGCAAGGGT	GATGCAGGCG
3970	3980	3990	4000	4010	4020
CAGAGGTTTA	CCTCCACAAC	TGTGCCATCT	GCCATATGAA	CGATGGCACT	GGTGTC AACC
4030	4040	4050	4060	4070	4080
GCAATGTTCC	GCCGCTGGCT	GGCAACCCGG	TCGTCAATCA	GGACAATGCA	ACCTCAATGG
4090	4100	4110	4120	4130	4140
CCAACATCGT	GACATTCGGC	GGTATTCTGC	CTCCGACGAA	TACGGCGCCA	TCTGCTGTTG
4150	4160	4170	4180	4190	4200
CCATGCCGGG	CTTCCCGGAT	CATCTGTCTG	ACCAGCAGAT	CGCCGATGTT	GTGAACCTCA
4210	4220	4230	4240	4250	4260
TGCGCAAGAG	CTGGGGCAAC	CAGGCTCCGG	GAACCCCTGC	TGCCTCGGAT	ATCCGCAAGC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
TCCGCACATC	GGGTACTGCG	GTTTCCACGG	CCGGCTGGAA	CGTCTCTTCC	AAGGGCTGGA
4330	4340	4350	4360	4370	4380
TGGCCTACAT	GCCGCAGCCT	TATGGCGAAG	GCTGGACCTT	CTCCCCGCAG	ACACACACGG
4390	4400	4410	4420	4430	4440
GCGTGGATCA	GGCTCAGTAA	GCCTCTCCAG	ACCCTGTCAG	TCTGACAGAA	AAGGGCGGTC
4450	4460	4470	4480	4490	4500
CGGATACGGG	CCGCCTTTTT	CTTTTGATAT	CAGGCCGTTT	TCACAGGATG	GCATCCTGCA
4510	4520	4530	4540	4550	4560
CTACATATGA	AGGCATGACT	CCCTTCTCGT	CTTCTGCTCC	GCAGTCAGTT	TTTCCTTTGG
4570	4580	4590	4600	4610	4620
CAACAGGCGC	AGGCCGCGCA	GCATTGCCAT	CATGCGCGCC	AGGACCCGGA	AGCGCCGAGC
4630	4640	4650	4660	4670	4680
TTCTCAAGAG	CCTCTGCGGT	TCCCTTCCTG	ACCCTCGACG	CGCCACCTGC	GCAGCTGCGC
4690	4700	4710	4720	4730	4740
CATCAAGGCG	AAGTGCTGGA	TCATGCCGTG	GTTCTCTGGC	TTCTTGGAAC	GAAATCCTAC
4750	4760	4770	4780	4790	4800
ACCGGCGAAG	ACGGGTGTGG	AACTCCACCT	TCATGCTGGA	CCCGCTGTTA	TCACTCGCGT
4810	4820	4830	4840	4850	4860
TGCGGATGCT	CTGACCGATC	TGGGTGCACG